

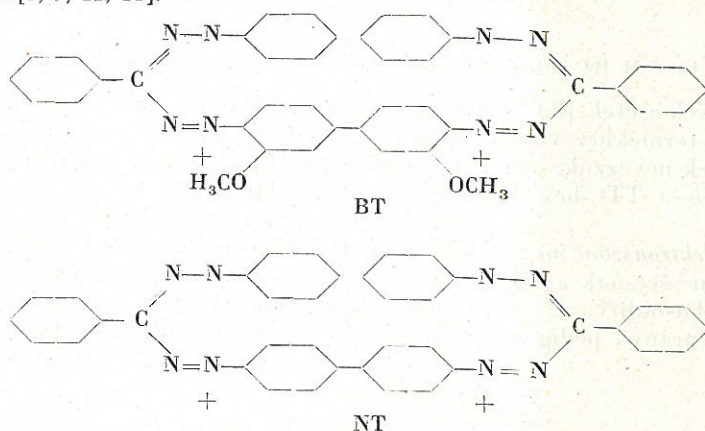
## Ditetrazolium-sók polarográfiás vizsgálata

JÁMBOR BÉLA és BAJUSZ EÖRS

*Eötvös Loránd Tudományegyetem Növényélettani Intézet, Budapest*

Mint ismeretes, a trifeniltetrazoliumklorid (TTC) a biológiai kutatásban nagymértékben elterjedt redoxindikátor, mely pl. növényi és állati szövetekben a dehidrogenáz-aktív helyek kimutatására, sőt ezen enzimek aktivitásának mérésére is alkalmas [10, 13, 15, 16]. Az ésszerű alkalmazás fontos feltétele, hogy a redukció kémiai mechanizmusát ismerjük. Ezért a TTC-t beható polarográfiás vizsgálatnak vetettük alá [2], valamint fotokémiai reakcióit is tanulmányoztuk [3].

Újabban a TTC mellett annak rokonai, a ditetrazolium-vegyületek is elterjedőben vannak, mivel ezek sötétebb színű formazánná redukálódnak. Két TTC-molekula összekapcsolása révén származtathatók le. Eddig legjobban bevált a 2,2'-p-(di-o-metoxi)-difenilén-3,3', 5,5'-tetrafenil-ditetrazolium-klorid, vagy „bluetetrazolium” (BT) és a 2,2'-p-difenilén-3,3', 5,5'-tetrafenil-ditetrazolium-klorid, vagy „tetrazol-purpur” (Neotetrazolium, NT). Előbbi kék, utóbbi bíborszínű formazánt ad [1, 9, 11, 14].



Biológiai fontosságuk, valamint elméleti érdekességük miatt a fenti vegyületeket is beható polarográfiás vizsgálatnak vetettük alá. Az alábbiakban közlendő eredményeink igazolják várakozásunkat, hogy ti. e kettős vegyületeknél a TTC esetében tapasztalt bonyodalmak fokozott mértékben fellépnek, sőt azokhoz újak is csatlakoznak.

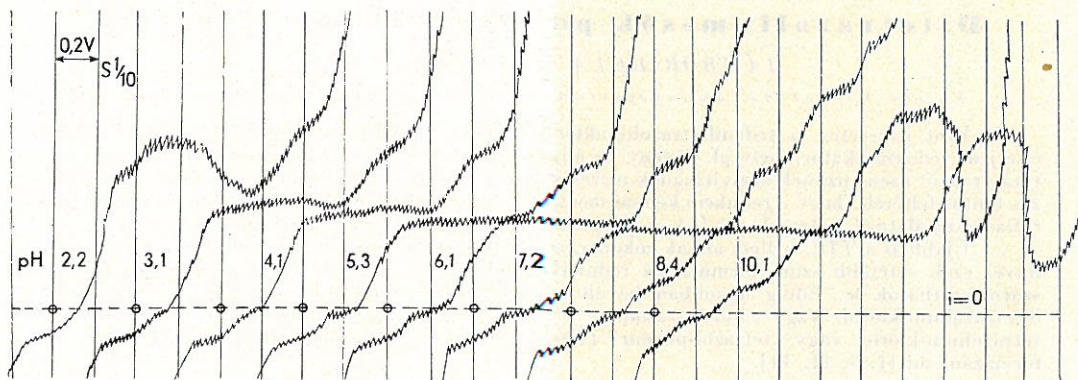
### Kísérleti rész

1. *Készülékek és módszerek* tekintetében általában az előző közleményünkben leírtak szerint jártunk el [2].

2. *Tájékozódó vizsgálat a polarogrammok lefutásáról.* Az 1. ábra  $10^{-4}$  mól BT polarogramját mutatja különböző  $pH$ -érték mellett felvéve. A TTC-vel tett tapasztalatok, ill. a valószínű analógia alapján feltehető volt, hogy a savas közegben látható első, kis lépcső adszorpciós lépcső, az egyetlen nagy lépcső pedig a benzohidrazidinképződésnek felel meg. Ez a redukció lúgos közegben két lépésben folyik le, vagyis a lépcső kettévál. A benzohidrazidinné való redukció a TTC esetében, mint láttuk 4 elektron felvételével történik s így a BT analóg redukciója 8 elektront igényel. Az ennek megfelelő lépcsőt — 1 V felett egy fele akkora másik lépcső követi. Ennek értelmezésére, ill. okának megállapítására nem terjeszkedtünk ki, mert biológiai jelentősége nincs: a lépcsőnek megfelelő redukció csak elektrolitikus,



illetőleg különleges kémiai módszer révén lehetséges. Jerchel és Kuhn [6] a TTC katalitikus hidrálásával megállapította, hogy a benzhidrazidint redukálva benzamidrazon keletkezik 2 H-atom felvételével. Valószínű tehát, hogy a kérdéses lépcső benzamidrazon-képződéssel kapcsolatos, de ez biztosan nem állítható,

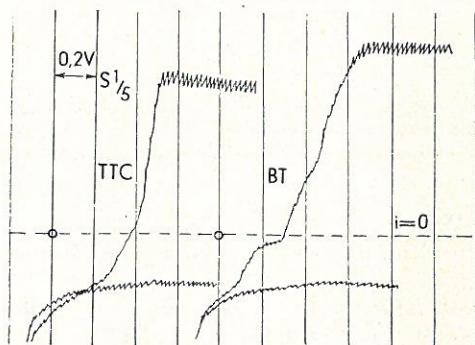


1. ábra

$10^{-4}$  M BT polarogramja különböző pH-érték mellett felvéve

mert ismeretesek esetek [8], amikor a csepőgő elektródon való redukció és a kémiai redukció más termékhez vezet. Amikor a kérdéses lépcsőt a továbbiakban amidrazon-lépcsőnek nevezzük, azt csak fenntartással tehetjük. Enyhén lúgos és erősen savas közegben a TTC-hez hasonlóan hullám látható  $-1,8$ , ill.  $-0,8$  V körüli potenciálon.

3. Az elektronszám megállapítása. A BT diffúziós állandója hozzávetőlegesen  $0,16 \cdot 10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/sec-nak adódott. A BT és az azonos koncentrációjú TTC polarogramját összehasonlítva (2. ábra) a lépcsőmagasságok aránya  $64 : 54$  mm, a diffúziós állandók aránya pedig  $0,16 : 0,50$ .\* Az Ilkovic egyenlet értelmében:



2. ábra

Az elektronszám megállapítására  $10^{-4}$  M TTC, BT, valamint az „üres puffer” (pH = 7,2) polarogramja

$$i = k \cdot n \sqrt{D}$$

A TTC ismert adataiból

$$54 = k \cdot 4 \cdot \sqrt{0,5}$$

$$k = \frac{54}{2,8} = 19,3$$

A BT-re nézve:

$$64 = 19,3 \cdot n \cdot \sqrt{0,16}$$

$$n = \frac{64}{19,3 \cdot 0,4} = 8,3 \sim 8$$

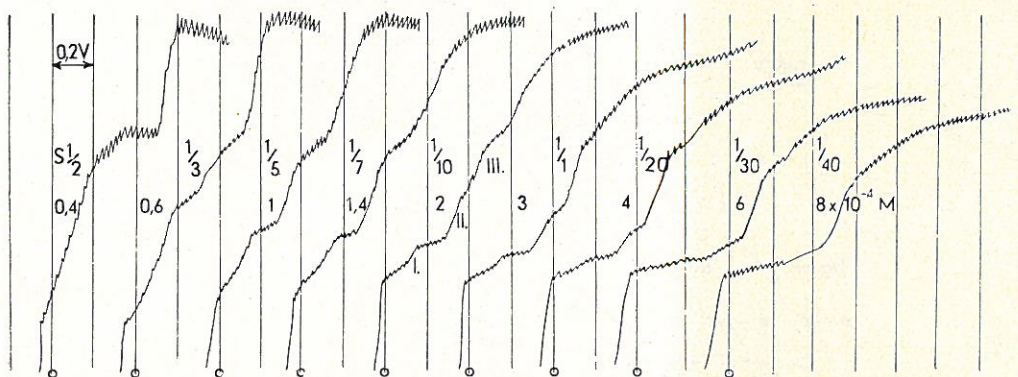
A TTC-vel való analógia tehát beigazolódott.

4. Az adszorpciós lépcsők vizsgálata. A TTC esetében láttuk [2], hogy annak adszorpciós lépcsője arról ismerhető fel, hogy egyrészt: magassága a higany-

\* Előző közleményünkben [5]



nívómagassággal egyenesen arányos, másrészt: azonos higanynívómagasság esetében az adszorpciós lépcső magassága állandó, vagyis független a koncentrációtól. Ez utóbbi szempont vizsgálatát szolgálja a BT koncentrációsorozatának polarogramja (3. ábra). E sorozat úgy készült, hogy a galvanométer árammentes helyzetét olyan magasságra állítottuk be a polarográf tologatásával, hogy az „üres puffer“ polarogramjának vízszintes része azonos magasságba kerüljön. Ezáltal elkerültük, hogy a „kapacitás-áram“ miatt nagy érzékenységnél a polarogramok felfelé tolódjanak el és ne férjenek a papírra. A másik „fogás“, amivel a sorozat áttekinthetőségét biztosítottuk, az volt, hogy a koncentrációkat és a galvanométer-érzékenységet úgy választottuk meg, hogy azok szorzata állandó legyen, vagyis, hogy a lépcsőmagasságok egyenlők legyenek.



3. ábra  
BT koncentráció sorozat  $pH = 9,0$

Az ábra azt mutatja, hogy fenti rendszabály ellenére a lépcsőmagasság a koncentráció növelésével csökken; mégpedig mind az első, mind a második redukciós lépcsőé. E jelenséget a TTC esetében is észleltük, a magyarázatát abban láttuk [2], hogy egyrészt a keletkező formazán egy része kicsapódván, nem tud tovább redukálódni s ezért kisebb a második lépcső; másrészt a kicsapódott formazán a higanycepp körül adszorbeálja az oda diffundáló BT egy részét s ezért csökken az első lépcső magassága is.

Visszatérve a polarogram-sorozat felvételének eredeti céljára, az adszorpciós lépcsőre, az ábrát megtekintve két adszorpciós lépcső is látható: az első (I.) —  $0,1$  V-nál van, magassága kb.  $0,2 \cdot 10^{-4}$  M koncentrációnak felel meg, a második  $\pi 1/2$  értéke kb.  $-0,3$  V, magasságának megfelelő koncentráció pedig kb.  $1,2 \cdot 10^{-4}$  M. Ez a második adszorpciós lépcső (II.) meglepő módon a második redukciós lépcsőre is áttekint, ha a BT koncentrációja  $1,4 \cdot 10^{-4}$  M-nál kisebb. Ezek alapján az 1. ábrán közölt polarogramokon az első redukciós lépésnek megfelelő lépcső E  $1/2$  értéke voltaképpen nem a valódi redukciós potenciálnak felel meg, hanem a II. adszorpciós lépcsőnek. Az első redukciós lépés redukciós potenciáljának megállapítására tehát minél nagyobb koncentrációban kell a polarografálást végezni, hogy az adszorpciós lépcsők minél kisebb hányadát foglalják el s érvényesülhessen a valódi redukciós lépcső.

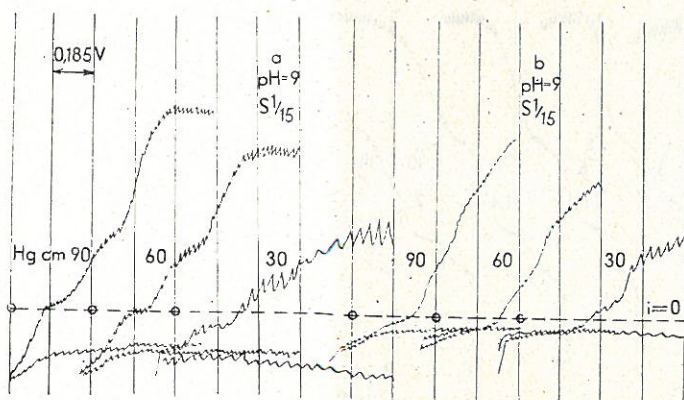
Sokkal nehezebb problémát jelent a második redukciós lépés redukciós potenciáljának megállapítása. Mint látjuk,  $1,4 \cdot 10^{-4}$  M koncentráció alatt a II. adszorpciós lépcső; afelett pedig a formazán kicsapódása eltorzítja a megfelelő lépcsőt. Ez az egyetlen koncentráció érték, melynél egyik hatás sem zavar s így a



második redukciós lépés potenciáljának megállapítása csak ezen koncentráció mellett felvett polarogramokról lehet séges.

Az adszorpciós lépcsőkre jellemző második törvényszerűség, mint mondtuk a higanynívótól való függésük. A 4. ábrán közölt polarogramok alapján láthatjuk, hogy az I. adszorpciós lépcsőre nézve nem áll fenn az egyenes arány. Viszont a teljes lépcsőmagasság megfelel a négyzetgyökös törvénynek, ez a diffúziós lépcsőkre érvényes.

A 4b ábrán a két adszorpciós lépcső együttes viselkedését láthatjuk. A két lépcső összege már követi az egyenes arányosság törvényét; a két adszorpciós lépcsőnek az egyenes arányosságtól való eltérése valószínűleg azzal magyarázható, hogy itt az egyszerre fellépő két adszorpciós folyamat egymást zavarja.



4. ábra

BT polarogramja, különböző Hg-nívó mellett felvéve, a)  $(10^{-4} \text{ M}, \text{pH}=9)$ , b)  $(3 \cdot 10^{-4} \text{ M}, \text{pH}=9,0)$

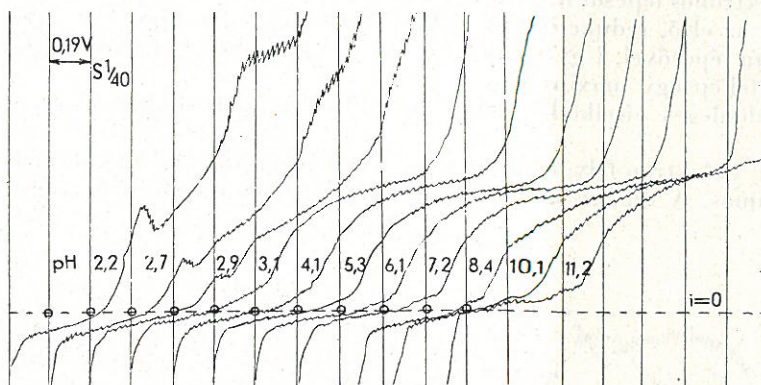
Hogy a BT-nek két adszorpciós lépcsője van, az a TTC-vel való analógia alapján várható is, mivel a redukció során mono- és diformazán is keletkezhet s ezeknek nyilván eltérő az adszorpcióképessége. Ha az adszorpcióképességet az adszorpciós lépcső magasságával jellemezzük, akkor a TTC formazánja esetében ez  $0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , a BT-monoformazánál, mint láttuk,  $0,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , a BT diformazánjánál  $1,2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ -nak felel meg, az adott kísérleti feltételek mellett.

5. A redukciós potenciál/ $\text{pH}$  függvény. Mint említettük, az első redukciós lépés potenciálját csak nagyobb, pl.  $8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  koncentrációjú BT-oldat polarogramjaiból állapíthatjuk meg, mert az adszorpciós lépcső zavaró hatása így elkerülhető. Az 5. ábrán közölt polarogramm sorozatot így vettük fel. Az első redukciós lépés féllépcső potenciálját a  $\text{pH}$  függvényeként a 6. ábra BT 1. görbéje mutatja. Meglepő, hogy a redukciós potenciál az oldat  $\text{pH}$ -értékétől függetlennek bizonyul, szemben a TTC, [2] és GTC [4] megfelelő értékeivel. Mivel a formazán képződésben H feltétlenül részt vesz, a rendellenes  $d \pi^{1/2}/d\text{pH}$  függvény a folyamat irreverzibilitására vezethető vissza.

A második redukciós lépés potenciáljának megállapítása, mint szintén láttuk,  $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$  koncentrációjú oldat polarogramjaiból lehetséges. Mivel ez a sorozat igen hasonlít az 1. ábrához ( $10^{-4} \text{ M}$ ), itt külön nem közöljük, hanem csak az arról leolvasott féllépcsőpotenciálokat jelöltük meg a 6. ábrán. Mint látjuk, a második lépés (a benzidrazidin képződés) potenciálja  $\text{pH}$  egységenként 60 mV eltolódást szenved. A kibővített Nernst-képlet szerint 0,06 mV-al tolódik el  $\text{pH}$ -egységenként a redoxpotenciál, ahol m a reakcióban résztvevő H-ionok, n az



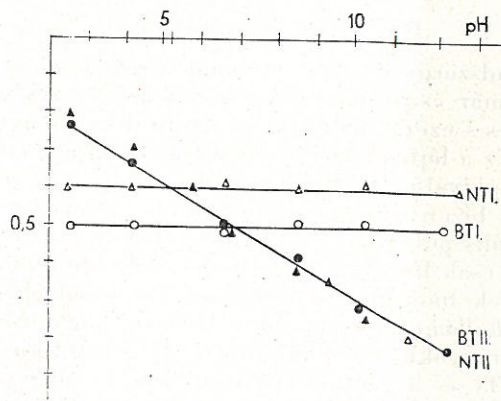
elektronok száma. Mivel az eltolódást 60 mV-nak találtuk,  $m/n = 1$ , vagyis  $m = n = 4$ . Ugyanis a második lépés elektronszáma, mint megállapítottuk, 4, tehát a felvett H-ionok száma is ugyanannyi. Ez utóbbi tekintetben hasonló a helyzet,



5. ábra

8.  $10^{-4}$  M BT polarogramja, különböző pH érték mellett felvéve

mint a TTC esetében. A hasonlóság abban a tekintetben is fennáll, hogy a két lépés sorrendje egy bizonyos pH-érték alatt és felett megcserélődik. A formazánképződés tekintetében azonban csak  $pH = 9$  felett áll fenn a hasonlóság a TTC-vel, ez alatt a  $TTC \rightarrow TF$  reakció potenciálja 30 mV eltolódást szenved pH-egységenként, a  $BT \rightarrow BF$  potenciálja viszont állandó marad.



6. ábra

A BT és NT első és második redukciós lépésének potenciálja a felvett polarogramok alapján, normál kalomelelektroddhoz viszonyítva

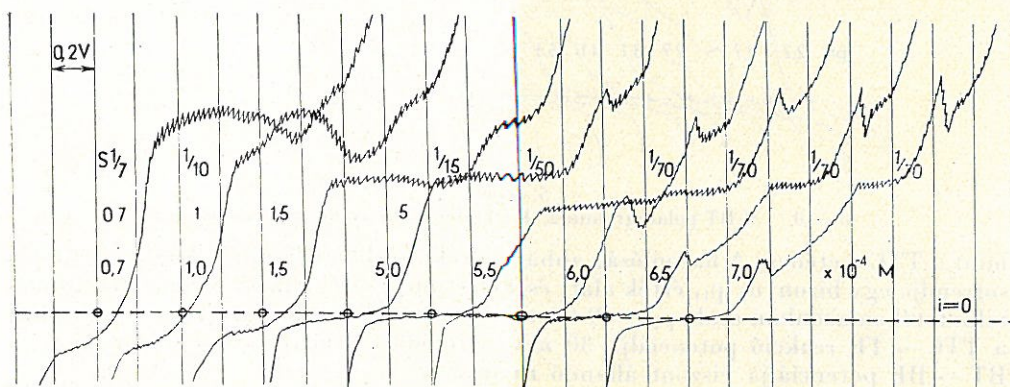
6. *Egy különleges jelenség.* Az 5. ábrát megtekintve, láthatjuk, hogy ha az oldat pH értéke  $pH = 5$  alá csökken, a II. adszorpciós lépcső magassága növekszik, míg végül eléri a 4 elektron felvételének megfelelő magasságot. Ezután a polarogrammon egy maximum látható, majd utána az első redukciós lépcső kis darabja látható  $-0,5$  V potenciálon. Ezután egy újabb 4 elektronos lépcső következik, melynek lefutása azonban szabálytalan aszimmetrikus. Hogy e jelenség létrejöttét



fejlődésében jobban megfigyelhessük, a 7. ábrán közölt polarogramm-sorozatot is elkészítettük, melyben a BT oldat koncentrációját  $pH = 2,5$  mellett változtattuk. Az ábra azt mutatja, hogy  $5,5 \cdot 10^{-4} M$  koncentráció alatt az adszorpciós lépcső a teljes, 8 elektronos lépcsőt lefoglalja, a koncentrációt növelve, az említett maximum megjelenik az első, redukciós lépés lépcsőjének egy darabjával s egyre magasabb szabálytalan lépcsővel. Ugyanakkor a  $-1 V$  körüli, kb. 4 elektronos (amidrazon-) lépcsőn is fellép egy maximum.

A különleges viselkedés magyarázatát a következőkben kísérhetjük meg megadni:

A BT 4 elektron felvételével olyan közbenső terméké alakul, mely dimerizációra hajlamos. A dimerizált molekula adszorptióképessége igen nagy s ezért nő



7. ábra  
BT koncentráció-sorozat,  $pH = 2,6$

savas közegben az adszorpciós lépcsők magassága. Viszont a dimerizált termék további redukciója már csak nagyobb energia befektetésével, tehát negatívabb potenciálon lehetséges s ezért alakul ki az említett „szabálytalan lépcső”  $-0,7 V$  körüli potenciálon. Ez a lépcső azért csak savanyú közegben tud kialakulni, mert különben a formazánkiválás miatti zavar lép fel.

E magyarázat bizonyítására vizsgálataink nem terjeszkedtek ki, mert nyilvánvalóan speciális polarográfiai jelenségről van szó s a szereplő tényezők sokfélesége miatt az csak hosszadalmas munkával volna lehetséges: ez nem volna arányban a kérdésnek biológiai alkalmazása szempontjából való fontosságával.

7. *Katalitikus hullámok.* Az 1. ábrán látható, hogy erősen savas és kb. semleges közegben „nem csökkenő maximum”, ill. katalitikus hullám mutatkozik, hasonlóan, mint a TTC és a „foto-TTC” esetében. E hullámokkal e helyen részletesen nem foglalkozunk, mivel elsődleges célunk a biológiai használhatóság szempontjából fontos körülmények tisztázása. Meg kell még jegyezni, hogy az említett hullámok nem mutatják egyértelműen a katalitikus hullámok sajátosságait.

8. *A „tetrazol-purpur” polarográfiai viselkedése.* Az NT-ről készült polarogramok általában egészen hasonlóak a BT-éhez s ezért a készült felvételek közül itt csak azokat közöljük, melyeken a BT-hez képest eltérő viselkedés figyelhető meg. Az első redukciós lépés potenciálját különböző  $pH$ -érték mellett a 6. ábra mutatja s eszerint ez mintegy 100 mV-al pozitívabb a BT-nél. A második lépés viszont a mérési hibahatáron belül megegyezik a BT-vel.

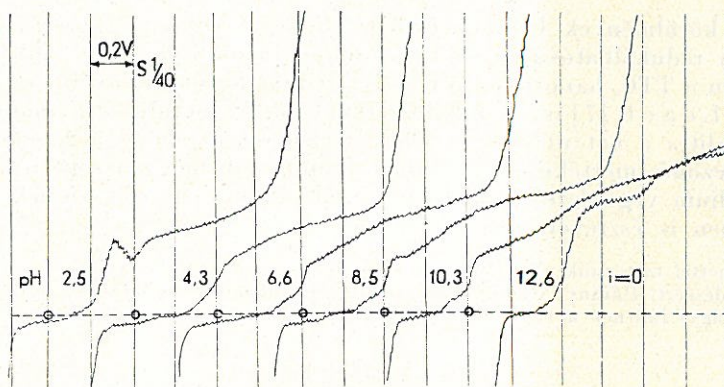
Érdekes, hogy a BT két metoxi-csoportja milyen döntő hatása a formazán színére, viszont a redukciós potenciálra alig van hatással.



Lényeges eltérést mutat a 12. ábrán az NT a leírt „különleges jelenség” kapcsán. Nem lép fel az aszimmetrikus, rendellenes lefutású, a 8 elektron felvételének megfelelő magasságig emelkedő lépcső. Ez arra mutat, hogy az NT formazánja kevesebb ideig tud túltelített oldatban maradni savanyú közegben, mint a BF s kikapcsolódása megakadályozza a benzhidrazidin-képződés létrejöttét.

A másik különbség a BT-vel szemben az, hogy lúgos közegben az NT kicsapódó formazánja nem adszorbeálja az NT-t a Hg-csepphez ez akadálytalanul oda diffundálhat : s így az első redukciós lépés lépcsője eléri a teljes, 4 elektronnak megfelelő magasságot.

9. A  $BT \rightarrow BF$  reakció reverzibilitása kérdésének kísérleti bizonyítására sok sikertelen erőfeszítést fordítottunk. Nem sikerült ui. olyan oldószert találnunk,



8. ábra

$8 \cdot 10^{-4}$  M NT, polarogrammja különböző pH-érték mellett felvéve

mely a BT-t és formazánját is egyaránt oldja s amellet polarográfiai szempontból inaktív. Ha ezekből a kísérletekből mégis megengedhető volna következtetést levonni, akkor a reakció irreverzibilitása látszik valószínűbbnek, alátámasztva az 5. pontban e kérdésben közölteket.

### Az eredmények értékelése

A ditetrazólium vegyületek polarográfias viselkedése sokban hasonlít a TTC-éhez, de a két TTC-molekula kapcsolódásának hatása is érvényesül. Ezek a különleges jelenségek általában speciális polarográfias sajátságok, melyek a szóbanlevő vegyületek biológiai indikátorként való használatát közvetlenül nem érintik. Tudomásunk szerint a ditetrazólium vegyületek eddig egyedülállóak abban, hogy 2 adszorpciós lépcsőjük van, nem is szólva a kísérleti rész 6. pontjában ismertetett „különleges jelenség”-ről.

Ami már most a formazánna való redukció potenciálját illeti, ez semleges közegben a TTC-nél  $-0,09$  V, az NT-nél  $-0,12$  V, a BT-nél pedig  $-0,21$  V, a  $n-H_2$ -elektrodra vonatkoztatva. Ebből az következne, hogy legkönnyebben a TTC volna redukálható, legnehezebben a BT. Előző közleményeinkben rámutattunk azonban [2, 5], hogy a formazánok oldhatatlansága bizonytalaná teszi az ilyen következtetést. Hozzájárul ehhez még az is, hogy a redukció kisebb-nagyobb mértékben irreverzibilis lehet. Mint láttuk, minden valószínűség szerint irreverzibilis a vizsgált 2 ditetrazólium vegyület redukciója s a TTC-é is csak lúgos közeg-



ben reverzibilis. (Folyamatban levő vizsgálataink szerint a TTC reverzibilitása a  $pH$  csökkenésével csökken.)

Minthogy polarográffal az irreverzibilis reakciók lépcsője nem a szabad-energiának megfelelő potenciálon, hanem az aktiválási energiának megfelelő túlfeszültséggel jelentkezik, az így kapott redukciós potenciál értékek a redukálhatóságnak csak az esetben lehetnek fokmérői, ha az aktiválási energiát csökkentő tényezők nincsenek az oldatban. Ilyen hatásúak biológiai anyagokban bizonyos enzimek, a polarográfiánál a Hg-csepp adszorbeálóképessége, a potenciométeres redox-titrálásnál a „mediátorok”. Valószínűleg adszorpciós hatás révén csökkenti az aktiválási energiát a hő-denaturált vérszérum [17] és a zselatin is [3]. A fény is aktiválási energiát csökkentő hatásúnak bizonyult a TTC-nél, a BT-nél ellenben nem [3].

Ilyen körülmények között érthető, hogy a redukciós potenciál csak egyik tényezője a redukálhatóságnak. Ezzel magyarázható pl., hogy szulfhidril vegyületekkel nem a TTC, hanem az NT és BT redukálhatók könnyebben [12]. Ugyanezt észlelte Leach [7] is, redukálószerként dihidrometilnikotinamidot használva.

Bonyolítja a két utóbbi észlelet értékelését az, hogy a redukció mértékét csak a színeződés mértékéből, szemmel állapították meg, viszont ismeretes, hogy a ditetrazolium vegyületek formazánjai sokkal intenzívebb színűek, már kisebb mennyiségben is észrevehetőek.

Köszönettel tartozunk W. Ried úrnak a BT, a Farbenfabriken Bauer cégnek az NT szíves átengedéséért, Bárány Mihálynénak a diffúziós állandó meghatározásáért, Kishán Klárának és Vágvölgyi Editnek a technikai segítségért.

### Összefoglalás

A „blue tetrazolium” és „neotetrazolium” néven ismert és biológiai redukciós indikátornak használt ditetrazolium vegyületek polarográfiás vizsgálata alábbi eredményekre vezetett:

1. Két adszorpciós lépcsőjük van és valószínűleg 4 katalitikus hullámot adnak, de az utóbbiak rendellenesen viselkednek.

2. A formazánná való redukció potenciálja a közeg  $pH$ -értékétől független: a BT esetében  $n-H_2$  elektródra vonatkoztatva  $-0,22$  V, az NT esetében  $-0,12$  V. A redukció minden jel szerint irreverzibilis, tehát a megadott potenciálok az aktiválási energiát is magukban foglalják. Megfelelő enzimek jelenléte redukálhatóságukat kisebb-nagyobb mértékben fokozhatja.

3. Az 1 és 2 helyzetű N-atomokon való redukció potenciálja  $pH$ -egységenként  $60$  mV eltolódást mutat. Ennek következményeként a redukció savas és lúgos közegben más utat követ, a TTC-hez hasonlóan.

4. Mindkét vizsgált vegyület a redukciókor keletkező és kicsapódó formazán miatt a TTC-hez hasonlóan rendellenes polarogramot ad.

5. A BT savas közegben és nagyobb koncentrációban ( $6 \cdot 10^{-4}$  M felett) polarografálva —valószínűleg egy közbenső termék dimerizációja folytán— további különleges jelenséget okoz: az első adszorpciós lépcső magassága erősen nő és egy újabb, rendellenes lefutású lépcső jelenik meg negatívabb potenciálon; valószínűleg a dimerizált termék redukciós lépcsője.

6. Az NT ezt a különleges jelenséget az adott feltételek mellett nem mutatja, viszont lúgos közegben is elmarad az első redukciós lépcsőnek a kicsapódott formazán miatti csökkenése (l. 4. pont).

Érkezett: 1955. március 1.



## Irodalom

- [1] Antopol, W., Glaubach, S. & Goldman, L.: U. S. Publ. Health Rep. **63**. 1231. 1948.
- [2] Jám bor, B.: Acta Chim. Hung. **4**. 55. 1954.
- [3] Jám bor, B.: Agrokémia és Talajtan. **5**. 89., 99., 111. 1956.
- [4] Jám bor, B. & Mester, L.: Agrokémia és Talajtan **5**. 127. 1956.
- [5] Jám bor, B.: Annal. Biol. Univ. Hung. **2**. 97. 1952.
- [6] Jerchel, D. & Kuhn, R.: Liebigs Ann. **568**. 185. 1950.
- [7] Leach, S. J.: Személyes közlés.
- [8] Müller, O. H.: „Polarography.” Weissberger, A.: „Physical Meth. Org. Chem.” XXVIII. 1841. New York. 1949.
- [9] Neumann, K. & Koch, G.: Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. **295**. 35. 1953.
- [10] Ried, W.: Angew. Chemie. **64**. 391. 1952.
- [11] Ried, W. & Gick, H.: Liebigs Ann. **581**. 16. 1953.
- [12] Roberts, L. W.: Stain Techn. **29**. 63. 1954.
- [13] Roberts, L. W.: Diss., Univ. Missouri. (Mikrofilm) 1952.
- [14] Rutenburg, A. M., Seligmann, A. M. & Gofstein, M.: Cancer Res. **10**. 113. 1950.
- [15] Smith, F. E.: Science **113**. 751. 1951.
- [16] Soncin, E.: Arch. Ital. Sci. Pharmacol. **4**. No. 3. 1954.
- [17] Stüttgen, G.: Klin. Wschr. **19**. 766. 1951.

## ПОЛЯРОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИТЕТРАЗОЛИЕВЫХ СОЛЕЙ

Б. Ямбор и Э. Баюс

Кафедра физиологии растений Университета им. Л. Зтвеша, Будапешт (Венгрия)

## Резюме

Полярографическое изучение дитетразолиевых соединений, применяемых в качестве биологических восстановительных индикаторов и известных под названием «blue tetrazolium» (БТ) и «neotetrazolium» (НТ), привело к следующим результатам: 1. Имеются две адсорпционные ступени и — по всей вероятности — 4 каталитические волны, но последние ведут себя аномально.

2. Потенциал восстановления в формазан не зависит от величины рН среды; в случае БТ относительно электрода н-Н<sub>2</sub> равен — 0,22В, а в случае НТ — 0,12В. Восстановление является по всем признакам необратимым, следовательно указанные потенциалы включают в себя и энергию активирования. Наличие соответствующих ферментов может в большей степени повысить их восстанавливаемость.

3. Потенциал восстановления на атомах азота в положении 1. и 2. обнаруживает сдвиг в 60 мВ на каждую единицу рН. В результате этого — аналогично ТТХ — восстановление идет по разному пути в кислой и щелочной среде.

4. Оба исследуемые соединения — аналогично ТТХ — дают аномальную полярограмму из-за образующегося в процессе восстановления и осаждающегося формазана.

5. При полярографировании БТ в кислой среде и в большой концентрации (выше  $6 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ) — вероятно вследствие димеризации одного промежуточного продукта — обнаруживается следующее особое явление: высота первой адсорпционной ступени резко возрастает, и появляется новая ступень аномального хода при более отрицательном потенциале. Эта ступень представляет собой вероятно восстановительную ступень димеризованного продукта.

6. НТ при данных условиях не обнаруживает этого особого явления, но и в щелочной среде не уменьшается величина первой восстановительной ступени вследствие осаждающегося формазана (см. пункт 1—4).

Рисунок 1.: Полярограмма  $10^{-4} \text{M}$  БТ при различной величине рН.

Рисунок 2.: Полярограмма  $10^{-4} \text{M}$  ТТХ, БТ и т. н. «пустого буфера» (рН = 7,2), снята для определения числа электронов.

Рисунок 3.: Различные концентрации БТ при рН = 9,0.

Рисунок 4.: Полярограмма БТ, снята при различном уровне ртути. а.):  $10^{-4} \text{M}$ , рН = 9; б.):  $3 \cdot 10^{-4} \text{M}$ , рН = 9,0.

Рисунок 5.: Полярограмма  $8 \cdot 10^{-4} \text{M}$  БТ, снята при различной величине рН.



Рисунок 6.: Потенциал первой в второй восстановительных ступеней БТ и НТ на основании снятых полярограмм (потенциал отнесен к нормальному каломельному электроду).

Рисунок 7.: Различные концентрации БТ при  $pH = 2,5$ .

Рисунок 8.: Полярограмма  $8 \cdot 10^{-4} M$  НТ, снята при различной величине  $pH$ .

## Polarographische Untersuchung von Ditetrazolium-Salzen

B. JÁMBOR und E. BAJUSZ

Pflanzenphysiologisches Institut der L. Eötvös Universität, Budapest (Ungarn)

### Zusammenfassung

Die polarographische Untersuchung der als Reduktions-indikatoren verwendeten »Blue tetrazolium« sowie »Neotetrazolium« benannten Ditetrazolium-Verbindungen führte zu folgenden Resultaten:

1. Sie besitzen zwei Adsorptionsstufen und ergeben wahrscheinlich vier katalytische Wellen. Die letzteren verhalten sich jedoch regelwidrig.

2. Die Potentiale der Reduktion zu Formazan ist vom  $pH$ -Wert der Lösung unabhängig und beträgt bei БТ bezogen auf die  $n-H_2$ -Elektrode  $-0,22 V$ , bei НТ  $-0,12 V$ . Allen Anschein nach ist die Reduktion irreversibel, somit enthalten die angegebenen Potentiale auch die Aktivierungsenergie. Die Anwesenheit entsprechender Enzyme vermag die Reduktionsfähigkeit in verschiedenem Masse zu erhöhen.

3. Die Reduktionspotentiale an N-Atomen der 1. und 2. Stelle zeigt eine Verschiebung von  $60 mV$  per  $pH$ -Einheit. Als dessen Folge läuft die Reduktion — wie bei TTC — in sauren und alkalischen Medien verschieden ab.

4. Ähnlich wie bei TTC ergeben beide untersuchten Verbindungen zufolge des bei der Reduktion entstandenen und gefällten Formazans regelwidrige Polarogramme.

5. In sauren Medien und bei höheren Konzentrationen (über  $6 \cdot 10^{-4} M$ ) polarographiert ergibt БТ — aller Wahrscheinlichkeit nach infolge der Dimerisation eines Zwischenproduktes — eine weitere eigentümliche Erscheinung: die Höhe der ersten Adsorptionsstufe wächst beträchtlich und es erscheint eine zweite, regelwidrig verlaufende Stufe von negativerem Potential. Dies ist wahrscheinlich die Reduktionsstufe des dimerisierten Produktes.

6. НТ zeigt die vorhin beschriebene Eigentümlichkeit unter den selben Umständen nicht; auch bleibt in alkalischen Medien die von dem gefällten Formazan bedingte Verminderung der ersten Reduktionsstufe aus (siehe Punkt 4.).

Abb. 1.: Polarogramm des БТ (Konzentration:  $10^{-4} M$ ) bei verschiedenen  $pH$ -Werten.

Abb. 2.: Polarogramm des БТ, TTC (Konzentration:  $10^{-4} M$ ) sowie des »leeren Puffers« ( $pH = 7,2$ ), zur Feststellung der Elektronenzahl.

Abb. 3.: БТ-Konzentrationsserie ( $pH = 9,0$ ).

Abb. 4.: Polarogramm des БТ bei verschiedenen Hg-Niveaus. a)  $10^{-4} M$ ,  $pH = 9,0$ .  
b)  $3 \cdot 10^{-4} M$ ,  $pH = 9,0$ .

Abb. 5.: Polarogramm des БТ (Konzentration:  $8 \cdot 10^{-4} M$ ) bei verschiedenen  $pH$ -Werten.

Abb. 6.: Die Potentiale der ersten und der zweiten Reduktionsstufe des БТ und НТ, auf Normal-Kalomelektrode bezogen.

Abb. 7.: Konzentrationsserie des БТ,  $pH = 2,5$ .

Abb. 8.: Polarogramm des НТ (Konzentration:  $8 \cdot 10^{-4} M$ ) bei verschiedenen  $pH$ -Werten.